

1/5/3

DIALOG(R)File 352:Derwent WPI

(c) 2006 The Thomson Corp. All rts. reserv.

003868419

WPI Acc No: 1984-013949/198403

XRAM Acc No: C84-005932

XRPX Acc No: N84-010208

Protein analysis - by dyeing protein in and/or on cellulose acetate film  
with silver colloidal soln.

Patent Assignee: CHUGAI PHARM CO LTD (CHUS ); TOKYO SEIKAGAKU SENKYUKA  
(TOKS-N)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 58205855	A	19831130	JP 8288900	A	19820527	198403 B

Priority Applications (No Type Date): JP 8288900 A 19820527

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 58205855	A	6		

Abstract (Basic): JP 58205855 A

Method comprises dyeing protein in and/or on cellulose acetate film  
using silver colloidal soln. A kit for the analysis of protein  
comprises at least a silver colloidal soln. as protein dyeing reagent  
and cellulose acetate film.

In a method using, e.g. electrophoresis, a sample (e.g. blood  
serum) is applied to cellulose acetate film and subjected to  
electrophoresis, and the film is immersed in a protein-fixing liq. to  
fix sepd protein and then immersed in a silver colloidal soln. to dye  
the protein. In the prepn. of the silver colloidal soln, silver salt  
(e.g. silver nitrate) and reducing agent (e.g. tannic acid) are  
dissolved in distilled water at 60-80 deg.C with stirring. A suitable  
amt. of weak alkaline soln. is added with stirring and then cooled to  
room temp.

By using cellulose acetate film as carrier, protein present in low  
concn. or trace amt. in a sample (e.g., blood serum, urine, etc) can be  
simply, rapidly and sensitively detected without concentrating.

0/3

Title Terms: PROTEIN; ANALYSE; DYE; PROTEIN; CELLULOSE; ACETATE; FILM;  
SILVER; COLLOID; SOLUTION

Derwent Class: A89; J04

International Patent Class (Additional): G01N-027/26; G01N-033/68

File Segment: CPI

?

THIS PAGE BLANK (USPTO)

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭58—205855

⑬ Int. Cl.<sup>3</sup>  
G 01 N 33/68  
27/26

識別記号

庁内整理番号  
8305—2G  
7363—2G

⑭ 公開 昭和58年(1983)11月30日

発明の数 3  
審査請求 未請求

(全 6 頁)

⑮ 蛋白質の分析方法および分析用キット

⑯ 特 願 昭57—88900

⑰ 出 願 昭57(1982) 5 月27日

⑱ 発 明 者 白幡晶

東京都練馬区豊玉上2の26

⑲ 発 明 者 岡田正志

東京都中野区若宮1の40の12

⑳ 出 願 人 財団法人東京生化学研究会

東京都豊島区高田三丁目41番8号

㉑ 出 願 人 中外製薬株式会社

東京都北区浮間5丁目5番1号

㉒ 代 理 人 安藤憲章

明 細 書

1. 発明の名称

蛋白質の分析方法ならびに分析用キット

2. 特許請求の範囲

- (1) 銀コロイド溶液でセルロースアセテート膜中及び／又は膜上の蛋白質を染色することを特徴とする蛋白質の分析方法。
- (2) 少なくとも蛋白質染色試薬としての銀コロイド溶液とセルロースアセテート膜との組み合わせからなることを特徴とする蛋白質分析用キット。
- (3) 少なくとも蛋白質染色試薬調製用としての銀塩、還元剤ならびに弱アルカリ性溶液とセルロースアセテート膜との組み合わせからなることを特徴とする蛋白質分析用キット。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、血清蛋白質をはじめとする体液中の蛋白質の分析方法ならびに分析用キットに関し特にセルロースアセテート膜を支持体として用いる蛋白質の分析方法ならびに分析用キットに関する。ある種の支持体を用いた体液中の蛋白質の分析

方法としては電気泳動法、免疫電気泳動法、免疫沈降反応法等があり、これらの方法において通常用いられる支持体としてはゼラチン、寒天、濾紙、ポリアクリルアミドゲル、セルロースアセテート膜等がある。中でもセルロースアセテート膜は薄くて均質な多孔質膜であること、試料や色素の吸着が少ないこと、微量の検体で実施できること、電気泳動の際泳動時のテーリング現象がほとんどないこと、各分画の分離が明瞭であること、透明化剤を用いると瞬時に透明になると、ポリアクリルアミドゲルの如き用時調製の必要がなく取り扱いが簡便であること等、多くの利点を有することから、広く生化学分野において用いられている。

このセルロースアセテート膜を支持体として用いる蛋白質の分析方法は微量の試料を迅速に分析できる点で優れており、特に電気泳動法による血清蛋白質の分析は臨床診断における重要な検査項目の一つにもなっている。

これらの分析方法によって蛋白質を検出する場合、セルロースアセテート膜中の蛋白質を染色す

る手段として、有機色素からなる染色試薬(ニグロシン、ボンソー3R等)が一般に用いられているが、当該染色試薬を用いた方法は検出感度が低いため、通常は蛋白質濃度の比較的高い試料(血清等)の蛋白質分析に用いられている。なお、この方法は脳脊髄液や尿、あるいはそれらと同様に蛋白質濃度の極めて低い試料を分析することもできるが、この場合は、分析過程において繁雑な濃縮操作によって、試料中の蛋白質濃度を上げる必要があり、セルロースアセテート膜を支持体として用いることの大きな利点である迅速性を犠牲にして分析を行なわなければならなかった。

本発明はセルロースアセテート膜を支持体として用いる蛋白質の分析方法において、セルロースアセテート膜の利点を損うことなく、試料中に低濃度に存在する蛋白質、あるいは極微量の試料中に存在する蛋白質を簡便、迅速かつ高感度に検出しうる方法を提供せんとするものである。

本発明者は上述の如き目的を達成すべく検討を重ねる中で、銀コロイドと蛋白質の強い相互作用、

つまり銀コロイドが蛋白質に吸着する力に着目し、蛋白質染色試薬として銀コロイド溶液を用いるという全く新規な方法によって前記目的を達成できるとの知見を得て本発明を完成した。

即ち、本発明は銀コロイド溶液でアセテート膜中及び/又は膜上(以下便宜上「膜中」という)の蛋白質を染色することを特徴とする蛋白質の分析方法である。

本発明はまた、少なくとも蛋白質染色試薬としての銀コロイド溶液とセルロースアセテート膜との組み合わせからなることを特徴とする蛋白質分析用キットであり、更にまた少なくとも蛋白質染色試薬調製用としての銀塩、還元剤ならびに弱アルカリ性溶液とセルロースアセテート膜との組み合わせからなることを特徴とする蛋白質分析用キットである。

本発明の分析方法において用いる銀コロイド溶液は、セルロースアセテート膜中に存在する微量の蛋白質を極めて高感度に染色することができる。また染色濃度と蛋白質量との間に一定の関係がみ

られることから、当該分析方法はセルロースアセテート膜を支持体とすることの利点とあいまって、脳脊髄液あるいは尿の如き試料中の蛋白質を、試料の濃縮操作を行うことなく高感度に検出並びに定量することができる。更に本発明の分析方法は内耳液の如き極微量しか採取できないような試料中の蛋白質も同様に検出並びに定量することができる。

本発明の分析方法は、例えば電気泳動法においては①セルロースアセテート膜に希釈した試料(例えば血清)を試料塗布器を用いて塗布、②通電して試料を泳動させる、③セルロースアセテート膜を蛋白固定化液に浸し、蛋白質を固定する、④このセルロースアセテート膜を銀コロイド溶液中に浸し、振とうしながら銀コロイドによる蛋白質染色を行う、の手順で実施される。

本発明に用いられる銀コロイド溶液は銀塩、および還元剤を適当量ずつとり、適当な量の蒸留水に添加、60~80℃で撹拌混合し、この混合物にさらに適当量の弱アルカリ性溶液を加えて撹拌

混合した後冷却、室溫に戻すことによって調製される。この際用いられる銀塩としては硝酸銀<sup>銀</sup>、過塩素酸銀、酢酸銀、炭酸銀、ヨウ素酸銀、乳酸銀、硫酸銀等が、還元剤としてはタンニン酸、ヒドラジン、レゾルシノール、ヒドロキノン、硫酸第一鉄が、また弱アルカリ性溶液としては炭酸ナトリウム、炭酸リチウム、炭酸カリウム、クエン酸ナトリウム、クエン酸リチウム、クエン酸カリウム等の溶液がある。

好ましい銀コロイド溶液の一例としては銀塩として硝酸銀、還元剤としてタンニン酸、弱アルカリ性溶液として炭酸ナトリウム溶液から調製された溶液が挙げられる。この場合用いる硝酸銀の量は、当該銀コロイド溶液全量に対し、0.02~0.32重量パーセント位が実用上好ましく、この範囲以下では蛋白質の染色に長時間を要し、また、この範囲以上ではセルロースアセテート膜自体を染色してしまいうので好ましくない。また同時に用いるタンニン酸および炭酸ナトリウムの量は、上記濃度範囲内で用いる硝酸銀の量に対し、それぞ

れ125/100~125/100の濃度比および5/100~25/100の濃度比の範囲内で用いることが実用上好ましい。タンニン酸の量が上記濃度比範囲以下では銀コロイドが非常に不安定になり、逆に該範囲以上となるとセルロースアセテート膜自体を染色するので好ましくない。また炭酸ナトリウムの量が上記濃度比範囲以下になるとセルロースアセテート膜自体を強く染色し、逆に該濃度比範囲以上になると銀コロイドが不安定になり実用に適さない。

尚、本発明において用いられる銀コロイド溶液は一般に吸収極大波長が390~420nm、好ましくは400~415nmの範囲にあり、かつ銀コロイド自体が蛋白質あるいはポリビニルピロリドンの如きコロイド保護剤で覆われていない状態のものであれば、どのような組成あるいはどのような方法によって調製されたものでもよい。

当該銀コロイド溶液を染色試薬として、セルロースアセテート膜中に存在する蛋白質を染色する場合、染色は約30分程度で完了するので、セル

-7-

染色液」という)は以下の如くして調製した。

#### 〔標準銀コロイド染色液の調製〕

20.0mlビーカーに再蒸留水98.2mlをとり70℃に加熱し、これに20重量パーセント硝酸銀溶液0.4mlと10重量パーセントタンニン酸溶液0.4mlを激しく攪拌下添加して混合した。更に10重量パーセント炭酸ナトリウム溶液1.0mlを添加し2分間攪拌混合した後、水で冷却し室温にもどした。

以下に実験例並びに実施例によって本発明を更に詳細に説明する。尚、実験例並びに実施例において用いたセルロースアセテート膜は、いづれも富士写真フィルム株式会社製「セブラックス」である。

#### 〔実験例1〕

縦6cm横6cmのセルロースアセテート膜を3枚用意し、これにそれぞれ7.5、15、30、75、150、300、750 $\mu$ g/mlの濃度の牛血清アルブミン溶液を0.36 $\mu$ lずつ直径約2mmの円形となるように5mm間隔で直列に2列スポットした。次

ろースアセテート膜を支持体とする蛋白質の分析の利点、つまり迅速性を損なうことなく蛋白質分析を可能にする。

また当該銀コロイド溶液は蛋白質の染色能力が極めて優れていることおよびセルロースアセテート膜自体はほとんど染色しないことから高感度かつ効率よく微量の蛋白質成分を染色することができる。

また当該銀コロイド溶液を4℃の冷蔵庫内に5か月間保存した後、蛋白質の染色を行なったが、染色性に全く影響はなく、当該銀コロイド溶液は、一定の条件下であれば長期保存が可能である。

以上の如く本発明の分析方法ならびに分析用キットはセルロースアセテート膜を支持体として用いる蛋白質の分析において、極めて高感度かつ迅速に蛋白質を検出あるいは定量することができる点において臨床分析分野に画期的な分析方法を提供するものである。

後述の実験例および実施例において用いた蛋白質染色用銀コロイド溶液(以下「標準銀コロイド

-8-

液」で各セルロースアセテート膜の該スポットを標準銀コロイド染色液、ボンソー3R染色液およびニグロシン染色液を用いて以下の方法により染色処理した。

#### (I) 銀コロイドによる染色

牛血清アルブミンがスポットされた上記セルロースアセテート膜を5%トリクロル酢酸溶液に2分間浸し蛋白質の固定を行なった後、軽く水ですすぎ、濾紙にはさんで余分な水分を除いた。次いで該膜を標準銀コロイド染色液に浸し、30分間振とうしたのち、該膜を取り出し、水の中で2分間振とうする洗滌操作を3回行なった。

#### (II) ボンソー3Rによる染色

ボンソー3R(半井薬品株式会社製)0.8g、トリクロル<sup>酢</sup>酸3.0gを蒸留水に溶解し、全量を100mlとしたボンソー3R染色液に牛血清アルブミンがスポットされた前記セルロースアセテート膜を2分間浸した後、該膜を取り出し1%酢酸溶液で洗滌した。洗滌は2分ずつ5回繰り返し行なった。

-9-

-10-

## (Ⅲ) ニグロシンによる染色

ニグロシン(東京化成株式会社製)0.01g、酢酸2.0mlを蒸留水に溶解し、全量を100mlとしたニグロシン染色液に牛血清アルブミンがスポットされた前記セルロースアセテート膜を一晚浸した。該膜を取り出し水で2分間ずつ5回洗滌を行なった。

以上(I)、(II)、(III)で染色処理された各スポットの染色濃度をデンスリトメーター(ヘレナ社製)で各染色に至適なフィルター(銀コロイド染色は420nmのフィルター、ボンソー3R染色は525nmのフィルター、ニグロシン染色は610nmのフィルター)を用いてスキャンした。各スポットに対応するピークの高さを染色濃度の指標として蛋白質量とピークの高さの関係をプロットし第1図に示した。

この図から明らかな如く銀コロイド溶液を用いる本発明の方法は従来セルロースアセテート膜中の蛋白質を最も感度よく検出するといわれているニグロシンに比べ、約6~7倍の感度で検出でき

-11-

## 〔実験例3〕

25倍希釈したヒト正常血清0.2μlを縦6cm、横6cmのセルロースアセテート膜上に塗布したものを実験例2と同様の方法で電気泳動し、次いで実験例1に示す「銀コロイドによる染色」の方法に従って標準銀コロイド染色液を用いて染色処理を施した。後、該膜を透明化液(MN-透明化液:半井薬品株式会社製)で透明化してからデンスリトメーター(ヘレナ社製)により420nmのフィルターを用いてスキャンし、その結果を第2図に示した。この図から明らかな如くアルブミンおよび各グロブリンの分画が確認できた。また実験例1の結果と合せて蛋白質の各成分の定量分析にも本発明の方法が応用できることが確認された。

## 実施例1

セルロースアセテート膜電気泳動法による脳脊髄液中の蛋白質成分の分析

脳脊髄液6検体及び250倍希釈血清2検体を約1μlずつ試料塗布器(ヘレナ社製)によって縦6cm、横6cmのセルロースアセテート膜上に塗布

ることが確認された。更に蛋白質量と染色濃度の関係が一定の範囲で直線性を示し、本発明の方法が蛋白質の定量分析に用いられることが確認された。

## 〔実験例2〕

縦6cm、横6cmのセルロースアセテート膜を3枚用意し、それぞれに25倍希釈したヒト正常血清を0.2μlずつ試料塗布器(ヘレナ社製)を用いて塗布し、これらを0.07Mペロナル緩衝液(pH=8.6)中で、セルロースアセテート膜の幅1cmあたり1mAを通電し、30分間泳動した。泳動後の3枚の該膜はそれぞれ標準銀コロイド染色液、ボンソー3R染色液およびニグロシン染色液を用いて、実験例1に示す染色方法により処理した。

この結果ボンソー3Rおよびニグロシンでは、泳動された蛋白質成分中アルブミン以外の蛋白質はほとんど検出不能であったが、銀コロイド溶液を用いた本発明の方法では各血清蛋白質成分が明瞭に検出できた。

-12-

し、次いで0.07Mペロナル緩衝液(pH=8.6)中でセルロースアセテート膜の幅1cmあたり1mAを通電し30分間泳動した。泳動後、該膜を5%トリクロル酢酸溶液に2分間浸して蛋白質を固定化した後、膜上の水分をふきとってから標準銀コロイド染色液に浸し、振とうしながら30分間染色処理を施した。次いで該膜を水中で2分間振とうする洗滌操作を3回繰り返して行なった。

この結果、アルブミン以外の比較的少量の蛋白質成分も明瞭に染色されその存在が確認でき、従来のセルロースアセテート膜電気泳動法では濃縮操作を必要とした脳脊髄液中の蛋白質分析も、本発明の方法では濃縮操作を行わずして簡便迅速に実施できた。

## 実施例2

セルロースアセテート膜電気泳動法による尿中の蛋白質成分分析

健康人で市販の蛋白検査用試験紙で陽性となった尿試料2検体をそれぞれ約1μlずつ縦6cm、横6cmのセルロースアセテート膜に塗布し実施例

-13-

-296-

-14-

1と同様の方法により泳動ならびに銀コロイド染色を施した。次いで該膜を透明化液(MN-透明化液:半井薬品株式会社製)により透明化した後、デンストメーター(ヘレナ社製)により420nmのフィルターを用いてスキャンし、第3図に示す染色像を得た。この図から明らかな如く、尿中の蛋白質成分が明瞭に確認でき、試料の濃縮操作等を行わずして分析することができた。

#### 実施例3

セルロースアセテート膜電気泳動法による内耳液の分析

内耳内リン液をマイクロシリンジを用いて、0.18μlずつ縦6mm、横6mmのセルロースアセテート膜上にマイクロシリンジにてスポットし、実施例1と同様の方法で泳動、銀コロイド染色を行った。

この結果、アルブミンおよびグロブリンの各成分が明瞭に検出された。

-16-

業株式会社製)を泳動方向にそってスポット位置から5mm離し直線的に塗布したのち流動パラフィン中で20時間放置した。後、該膜上の流動パラフィンを流水で水洗除去してから、実施例1と同様の方法で銀コロイド染色を行った。この結果、血清成分に対応する明瞭な沈降線が確認された。

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は、各染色試薬によって染色された各スポットの染色濃度と蛋白質量との関係を表すグラフである。—●—は本発明の銀コロイド溶液を、—○—はニグロシンを、—▲—はボンソー3Rを用いて染色したものである。

第2図は、血清成分のセルロースアセテート膜電気泳動分析において本発明で用いる銀コロイド溶液によって蛋白質を染色した際の染色状態をデンストメトリーにより表わした染色像である。↓印は試料塗布位置を示す。

第3図は尿成分のセルロースアセテート膜電気泳動分析において2種類の検体を電気泳動にかけた後、本発明で用いる銀コロイド溶液によって蛋白質を染色し、その染色状態をデンストメトリー

#### 実施例4

セルロースアセテート膜を支持体としたオクタロニー法における免疫沈降反応物の検出  
リン酸緩衝液で平衡化したセルロースアセテート膜の中心部に1μl/mlの牛血清アルブミン0.4μlを1点スポットし、その周位に5mm間隔に倍々希釈した抗牛血清アルブミン(生化学工業株式会社製)を0.4μlずつ6点スポットした。

これを流動パラフィン中で20時間放置し、その後水流で流動パラフィンを洗滌除去した。以後、実施例1と同様の方法により免疫沈降物を銀コロイド染色した。この結果、明瞭な沈降線が得られた。

#### 実施例5

セルロースアセテート膜免疫電気泳動分析における免疫沈降反応物の検出

縦6mm、横6mmのセルロースアセテート膜上にヒト血清0.4μlをマイクロシリンジを用いてスポットした後、実施例1と同様の条件下で泳動を行った。泳動後、抗ヒト血清ヤギ血清(生化学工

-16-

白質を染色し、その染色状態をデンストメトリーで表わした染色像である。↓は試料塗布位置を示す。

特許出願人

財団法人 東京生化学研究会  
(ほか1名)

代理人

安藤 憲 章



図 1

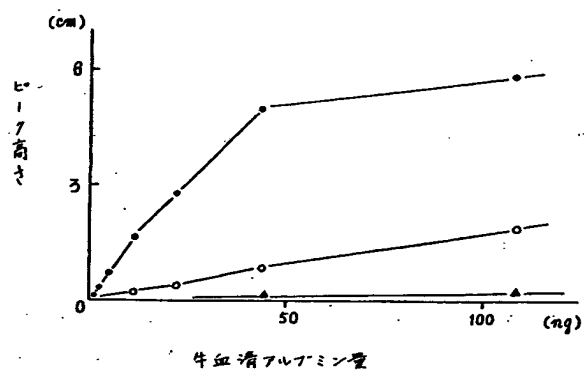


図 2

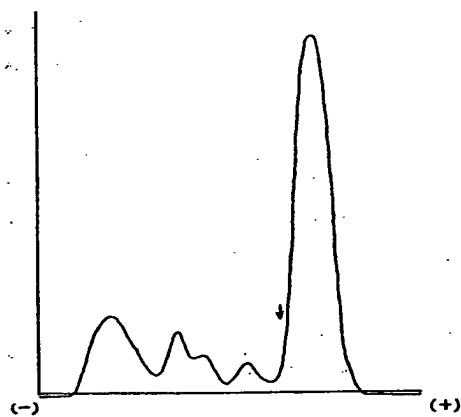


図 3

